

Susceptibilidad de aislados de *Mycosphaerella fijiensis* a los agentes de selección Higromicina B y Carbendazim

Mileidy Cruz-Martín^{1*}, Yelenys Alvarado-Capó¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Michel Leiva-Mora¹, Berkis Roque¹, Minerva Lezcano² *Autor por correspondencia.

¹Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: mileidy@ibp.co.cu

²Departamento de Química. Facultad de Química- Farmacia. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas.

RESUMEN

El estudio de las interacciones *Musa - Mycosphaerella fijiensis* asistido por herramientas moleculares como la transformación genética, puede contribuir a dilucidar nuevos mecanismos relacionados con la patogénesis y con ello permitir el desarrollo de fungicidas altamente selectivos, así como, la elaboración de estrategias de resistencia más duraderas. El trabajo desarrollado tuvo como objetivo, determinar la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de dos sustancias antimicrobianas utilizadas comúnmente como agentes de selección en ensayos de transformación genética de diferentes especies de *Mycosphaerella* (Higromicina B y carbendazim). Para ello se utilizó el método de dilución en agar y como inóculo se emplearon suspensiones miceliales de nueve aislados de *M. fijiensis* procedentes de varias regiones de la provincia de Villa Clara y Ciego de Ávila. Se ensayaron concentraciones decrecientes de estos desde 32.0 a 0.015 mg.l⁻¹. Se logró determinar la MCI de ambas sustancias antimicrobianas frente a los aislados de *M. fijiensis* mediante el método utilizado. Se comprobó además, que la MCI de la Higromicina B para el 100% de los aislados se halló en valores inferiores a 8 µg.ml⁻¹ y el 90% de los aislados mostraron, para el carbendazim, MCI menores e iguales a 0.125 µg.ml⁻¹. El aislado CCIBP-Pf-57 no logró ser inhibido a las concentraciones ensayadas del Carbendazim. Los resultados evidencian la importancia de conocer las MCI de los agentes selectivos que se utilizan en la transformación para así evitar escapes en la selección.

Palabras clave: Mínima Concentración Inhibitoria, *Pseudocercospora fijiensis*, sustancias antimicrobianas, suspensiones miceliales, transformación genética

ABSTRACT

The study of *Musa - Mycosphaerella fijiensis* interactions supported by molecular tools such as the genetic transformation could contribute to elucidate new mechanisms related with the pathogenesis and through it to allow the development of new selective fungicides as well as the elaboration of more durable resistance strategies. This work had as objective, to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of different antimicrobial substances commonly used as selection agents in the genetic transformation study of different species of *Mycosphaerella* (Hygromycin B and carbendazim). The agar dilution method was used and mycelial suspensions of nine of *M. fijiensis* isolated by several regions of Villa Clara and Ciego de Ávila was used as inoculums. Concentrations of these substances from 32.0 to 0.015 mg.l⁻¹ were rehearsed. It was possible to determine the MIC of both antimicrobials substances against the *M.fijiensis* isolated using this method. The MCI of the Hygromycin B for 100% of the isolated was less to 8 µg.ml⁻¹ and the rehearsed 90% of the isolated ones showed, for the carbendazim, MIC less or similar to 0.125 µg.ml⁻¹. CCIBP-Pf-57 isolated did not achieve to be inhibited to the rehearsed concentrations of the Carbendazim. The results obtained in this work evidence the importance of knowing the MIC of the selective agents that are used in the transformation avoiding escapes in the selection.

Key words: antimicrobial substance, genetic transformation, Minimal inhibitory concentration, mycelia suspension, *Pseudocercospora fijiensis*

INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra presenta una amplia distribución en todo el mundo (Jácome, 2003) y está considerada como la enfermedad más perjudicial para el cultivo de bananos y plátanos a nivel mundial (Pasberg-Gaul *et al.*, 2000). Es causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*).

El control se realiza fundamentalmente a través de aspersiones con productos químicos siendo el benomil, dentro del grupo de los benzimidazoles, el primer fungicida sistémico utilizado. No obstante, este grupo ha sido considerado de alto riesgo debido al creciente desarrollo de aislados resistentes. Teniendo en cuenta la resistencia que han adquirido las poblaciones del patógeno a muchos fungicidas, así como, las implicaciones

ecológicas y toxicológicas al medio ambiente y al propio hombre de tales productos, se desarrollan diferentes programas de mejoramiento genético con el propósito de obtener cultivares resistentes a esta enfermedad (Marin *et al.*, 2003).

Aunque la resistencia a la Sigatoka negra ha sido el objetivo de los programas de mejoramiento genético durante varios años, poco se conoce sobre lo inherente a la biología y diversidad dentro de las poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* así como el conocimiento de su interacción con *Musa*. Criterios clave para la asistencia a los programas de mejoramiento de plátanos y de manejos de la enfermedad (Carlier *et al.*, 2003).

El conocimiento de las funciones implicadas en el proceso de infección de los hongos fitopatógenos es un reto importante para la protección de plantas (Lebrun, 2002). Una de las alternativas para su estudio es la utilización de herramientas de la genética molecular que lleven a la caracterización de cantidades de genes requeridos para la expresión de la patogenicidad. Entre estas, se vislumbra con grandes posibilidades de éxito la transformación genética de patógenos fúngicos. Esto, en el patosistema *Musa-Mycosphaerella fijiensis*, contribuirá al desarrollo de fungicidas altamente selectivos así como podrá ser útil para desarrollar estrategias de resistencia duraderas en las plantas. Varios investigadores han realizado estudios de transformación genética en diferentes especies de *Mycosphaerella* entre las que se encuentran *M. graminicola* (Payne *et al.*, 1998), *M. fijiensis*, *M. musicola* y *M. eumusae* (Balint-Kurti *et al.*, 2001) utilizando como agente de selección en sus protocolos la Higromicina B y el algunos casos carbendazim (Payne *et al.*, 1998).

Teniendo en cuenta las razones expuestas anteriormente y la necesidad de conocer la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI) de estas sustancias frente a aislados de *Mycosphaerella fijiensis* para ser utilizados para tales fines, este trabajo tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad de diferentes aislados a Higromicina B y carbendazim.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de *M. fijiensis*

Se utilizaron nueve aislados pertenecientes a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Fitopatología del Instituto de Biotecnología de las Plantas. Los mismos fueron aislados a partir de hojas enfermas con síntomas en estado 6 (Fouré, 1985) del cultivar 'Grande naine' colectadas en diferentes localidades de la provincia de Villa Clara (Remedios, Vueltas, Santo Domingo y Santa Clara) y de Ciego de Ávila.

Sustancias antimicrobianas

- Higromicina B (SIGMA, 70 %)
- Carbendazim en forma de un complejo con β -ciclodextrina (Complejo I), (Facultad de Química-Farmacia de la Universidad Central Marta Abreu de Las Villas)

Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MCI)

La susceptibilidad de los aislados frente a Higromicina B y Carbendazim se evaluó a partir de la determinación de su MCI por el método de dilución en agar en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) (Biocen).

Se ensayaron concentraciones decrecientes de estos productos en diluciones seriadas dobles desde 32.0 a 0.015 mg.l⁻¹. Se prepararon dos repeticiones de cada concentración. Además, se incluyeron placas de Petri con medio de cultivo PDA libres de sustancias antimicrobianas para ser usadas como controles de crecimiento.

El inóculo utilizado fue una suspensión de micelio de cada aislado (3.5 μ l, 5.10⁵ fragmentos de micelio.ml⁻¹) adicionado sobre la superficie del agar con micropipeta multicanal (Placas de Petri de 90mm \varnothing).

Las placas de Petri fueron marcadas por el reverso para determinar la orientación de los puntos a inocular, en cada una se colocaron los aislados. Se inoculó primero el control de crecimiento con PDA, después, comenzando por la menor, se inocularon las placas de Petri que contenían las diferentes concentraciones del agente antimicrobiano. Posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que la humedad de los inóculos fue absorbida dentro del agar, se invirtieron y se incubaron a 28°C en la oscuridad. Las evaluaciones se realizaron a las 120h. En ellas se comprobó el crecimiento fúngico en los controles y se tomó como MCI la menor concentración del antimicrobiano que lo inhibió completamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró determinar la MCI de la Higromicina B y del Carbendazim frente a los aislados de *Mycosphaerella fijiensis* mediante el método de dilución en agar y como inóculo suspensiones miceliales.

La MCI de Higromicina B para el 66.6% de los aislados fue de 4 μ g.ml⁻¹ y para el 100% de los aislados se halló en valores menores e iguales a 8 μ g.ml⁻¹ (Tabla 1).

Tabla 1. Mínima Concentración Inhibitoria de Higromicina B y Carbendazim en medio de cultivo PDA frente a nueve aislados de *M. fijiensis* (concentración de inóculo de 2×10^5 fragmentos de micelio.ml⁻¹ de suspensión micelial) a las 120h de incubación a 28°C.

Aislado	Mínima Concentración Inhibitoria (µg.ml ⁻¹)	
	Higromicina B	Carbendazim
CCIBP- Pf- 39 ¹	4	0.0625
CCIBP- Pf- 34 ²	4	0.125
CCIBP- Pf- 64 ²	4	0.125
CCIBP- Pf- 54 ³	8	0.125
CCIBP- Pf- 66 ³	4	0.125
CCIBP- Pf- 57 ⁴	4	>32.0
CCIBP- Pf- 110 ⁴	4	0.125
CCIBP- Pf- 80 ⁵	2	0.0625
CCIBP-Pf- 83 ⁵	8	0.0625

¹ Remedios, ² Sto. Domingo, ³ Vueltas, ⁴ Ciego de Ávila, ⁵ Santa. Clara

Las MCI del carbendazim para el 90% de los aislados se encontraron en valores menores e iguales a 0.125 µg.ml⁻¹. Sin embargo, el aislado de Ciego de Ávila (CCIBP-Pf- 57) no pudo ser inhibido a las concentraciones ensayadas. El mismo se obtuvo en 'La Cuba', una plantación comercial de *Musa* spp. donde los programas de aplicación de fungicidas son comúnmente utilizados. Según Pérez (1996) los fallos de control en campo para el carbendazim se puede observar a partir de niveles de sensibilidad entre 1-5 µg.ml⁻¹, y Payne *et al.* (1998) consideran resistentes al carbendazim aislados de *M. graminicola* con MCI mayores de 10 µg.ml⁻¹. Teniendo en cuenta estos criterios el aislado CCIBP-Pf- 57 puede considerarse resistente. Este resultado tiene gran importancia ya que puede ser empleado para obtener el alelo de la β-tubulina, que le confiere resistencia a este compuesto, y emplearlo como marcador de selección en posteriores ensayos de transformación genética de este patógeno.

Varias son las investigaciones que para estudios de interacción hospedero-patógeno, utilizan la transformación genética. Dentro del género *Mycosphaerella* se han realizado en varias especies empleando como agente de selección la Higromicina B (Payne *et al.*, 1998; Balint-Kurti *et al.*, 2001) y el carbendazim (Payne *et al.*, 1998). La determinación o el conocimiento de las MCI de estos compuestos frente a diferentes aislados es crucial para tales fines.

Por ejemplo, el conocer que la Mínima Concentración Inhibitoria de Higromicina B para aislados de *M. fijiensis*, procedentes diferentes localidades está por debajo de 8 µg.ml⁻¹, posibilita adicionar el agente de selección a concentraciones superiores al valor de la MCI y no arbitrariamente como frecuentemente se encuentra referido en la literatura. Además, permite en cuanto a las concentraciones del agente de

selección, establecer protocolos generales de trabajo para la transformación de este patógeno y evitar escapes.

El carbendazim (bencimidazol 2-il carbamato de metilo) es el componente activo de varios fungicidas sistémicos entre los que se encuentra el benomil y están agrupados dentro de los benzimidazoles. En Cuba no se recomiendan más de dos tratamientos por año de estos productos. Pérez (1996) consideró los aislados resistentes como extremadamente competitivos y que eran frecuentes después de no utilizar los benzimidazoles por varios años. En el año 1995 en Costa Rica, se encontraron altos niveles de resistencia al benomil después de tres años que se había retirado este producto de los programas de control (Romero y Sutton, 1998).

Un aspecto a destacar en los resultados es que los aislados CCIBP-Pf- 57 y CCIBP-Pf-110 aún teniendo un mismo origen geográfico (La Cuba, en Ciego de Ávila) mostraron respuestas diferenciales en cuanto a susceptibilidad al carbendazim. Esto concuerda con los planteado por Marín *et al.* (2003) quienes informan la persistencia de aislados individuales resistentes a benzimidazoles dentro de las poblaciones de *M. fijiensis*.

La determinación de la MCI utilizando suspensiones miceliales como inóculo y no discos de micelio (como tradicionalmente se recomienda para otros hongos filamentosos; Hanson *et al.*, 1996), permitió minimizar la dificultad que representa el crecimiento extremadamente lento de este patógeno en medios de cultivo sólido (Meredith y Lawrence, 1969; Manzo *et al.*, 2001). Además, constituye una alternativa al uso de conidios como inóculo. Según Romero y Sutton (1997) la producción de éstos en *M. fijiensis* es un factor limitante para los ensayos de susceptibilidad ya sea por el bajo número de

conidios que se obtienen o por la incapacidad de producirlos por algunos aislados.

REFERENCIAS

- Balint-Kurti, P, May G, Churchill A (2001) Development of transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana. FEMS Microbiology Letters 195 :9-15
- Carlier, J, Hayden H, Rivas G, Zapater M, Abadie C, Aitken E (2003) Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. En: Jácome L, P Lepoivre, D Marín, R Ortiz, R Romero, V Escalant (eds). *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. pp: 123-130. INIBAP. Montpellier
- Fouré, E (1985) Black Leaf Streak Disease of Bananas and Plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA-CIRAD. París
- Hanson, L, Schwager S, Loria R (1996) Sensivity to Thiabendazole in *Fusarium* species associated with Dry Rot of Potato. Phytopathology 86 (4): 378-383
- Jácome, L (2003) Population biology and epidemiology. En: Jácome L, P Lepoivre, D Marín, R Ortiz, R Romero, V Escalant (eds). *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. pp:107-110. INIBAP. Montpellier
- Lebrun, M (2002) Molecular and Cellular biology of pathogenicity and resistance: *Magnaporthe grisea* / rice. 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas. San José, Costa Rica, pp. 31-32. INIBAP. Montpellier
- Manzo, G, Orozco M, Guzmán S (2001) Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios de cultivo líquidos. Revista Mexicana de Fitopatología 4: 66-71
- Marín, D, Romero R, Guzmán M, Sutton T (2003) Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. Plant disease 87(3):208-222
- Meredith, D, Lawrence J (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. Trans. Br. Mycol. Soc 52 (3): 459-476
- Pasberg-Gauhl, C, Gauhl F, Jones D (2000) Fungal disease of foliage. Sigatoka leaf spots. Black leaf streak. Distribution and economic importance. En: Jones, D (ed). Disease of banana, abaca and enset, pp. 37-44. CABI Publishing
- Payne, A, Grosjean M, Hollomon D (1998) Transformation of the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* to carbendazim and hygromycin B resistance. Curr. Genet 34: 100-104
- Pérez, L (1996) Manual para el manejo integrado de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder) en bananos y plátanos. Proyecto TCP/CUB/4454. Control de la Sigatoka negra del banano y del plátano
- Romero, R, Sutton T (1997) Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka of Banana, to propiconazole. Disease control and pest manament. Phytopatology 87(1): 96-98
- Romero, R, Sutton T (1998) Characterization of Benomyl Resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, Cause of Black Sigatoka of Banana, in Costa Rica. Plant Disease 82(8): 931-934